

First, to 300 ml of a JIS K3363 medium (NH_4Cl 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, KCl 0.025%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0002%, yeast extract 0.03%, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%) containing 10 ppm of polyethylene glycol dodecyl ether (EO_p=7, hereinafter, abbreviated as EO-7) which is one kind of polyoxyethylene-based nonionic surfactants as a carbon source, 20 ml of activated sludge were added and the whole was cultivated at 25°C while shaking. The concentration of EO-7 was increased in series of 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800, and 1,000 ppm, and an enrichment culture was attempted. As a result, after 25 days, the concentration reached to 1,000 ppm. The decomposition degree of EO-7 was measured by disappearance of bubbles, a cobalt isothiocyanate method (JIS K3364), and a gas chromatography analysis.

To a JIS agar medium containing 500 ppm of EO-7, a culture solution in which the decomposition was completed at 1,000 ppm of EO-7 was added and the whole was cultivated at 32°C for 24 hours, followed by collection of a single colony. After that, a plating method was repeated three times and a microorganism having an excellent decomposing ability was isolated. The microbe was acclimated to a concentration of 1,000 ppm of EO-7 again. The decomposition degree of EO-7 of the acclimated microbe was examined, and as a result, about 80% of EO-7 were decomposed through cultivation for 13 hours. The microbiological properties of the acclimated microbe (hereinafter, tentatively referred to as EO microbe) were

examined and the microbe was confirmed to belong to a novel microbial species.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 52-057389

(43)Date of publication of application : 11.05.1977

(51)Int.Cl.

C12K 1/00
// C12K 3/00
C12D 13/10

(21)Application number : 50-132423

(71)Applicant : LION CORP

(22)Date of filing : 06.11.1975

(72)Inventor : NEGI TAHE
SUGIYAMA KEIKICHI

(54) METHOD OF DECOMPOSING NONIONIC SURFACTANTS

(57)Abstract:

PURPOSE: To convert waste water containing polyoxyethylene type nonionic surfactants into harmless form by using a specific species of Pseudomonas genus.

を重ねた。

その結果、本発明者等はシユードモナス属の新菌種に属する微生物の菌体内生産物が顯著に非イオン界面活性剤分解能を有することを発見し本発明を完成した。

先づボリオキシエチレン系非イオン界面活性剤の1種であるポリエチレンクリコールドデシルエーテル(ヨロ-7 以下ヨロ-7と略称する)を炭素源として10 ppm含有するJIS K 3363培地(NH₄Cl 0.3%、K₂HPO₄ 0.1%、KCl 0.25%、FeSO₄·7H₂O 0.0002%、イーストエキストラクト 0.03%、MgSO₄·7H₂O 0.025%)300 mlに、活性汚泥 2.0 gを振り加し25℃で振とう培養した。ヨロ-7の濃度を10、50、100、200、400、600、800、1000 ppmと順次上昇させ斜面培養を試み、25日間で1000 ppmにまで達した。ヨロ-7の分解度の測定は泡沢の消失、コバルトテオシアネット法(JIS K 3364)、ガスクロマト分析によつて行なつた。

ヨロ-7 1000 ppmで分解が完了した培養液をヨロ-7 500 ppm含有JIS K 3363基大培地に加へ32℃、24時間培養し、单一コロニーを取り出し平板分離を3回繰り返してヨロ-7分解能の弱れた微生物を単離した。この菌を再度ヨロ-7 1000 ppmの濃度まで馴化し、この馴化菌のヨロ-7の分解度を試したところ13時間の培養でヨロ-7の約8.0%を分解した。この馴化菌(以下ヨロ菌と仮称する)の菌学的性質を試したところ新菌種に属することを確認した。

本ヨロ菌をバージース マニュアル オブ デターミナティブバクテリオロジイ第8版の方法並びに他の文献を参考にしてその形態学的及び生理学的性質を試した結果は下記の如くである。

形態学的性質

形態	桿菌、0.7~0.8×1.4~2.8
鞭毛	單毛、運動性有(弱)
グラム染色性	陰性
菌体の輪	直線
亜形培地表面集落(肉汁寒天培地)	

亜形(0.4~0.5 cm/3日)、均質、薄く中央凸、表面平滑、無色、光沢、中央少し亦、粘稠、辺縁平滑、不透明

斜面培地(肉汁寒天培地)

発育中、厚く、表面平滑、無色、形状一様、辺縁平滑、無臭

せんし培養

発育の程度有、表面の発育有、発育の状態様状

液体培地(肉汁培地)

発育の程度 酸弱、沈澱無、ガス発生無、無臭、着色無、滴り一様、表面発育無、

メチレンブルー色調変化無

酸素要求性 好気性

増殖温度 20~36℃ 最適36℃

増殖pH 5.0~9.0 最適7.3

色素产生 無

ゼラチン 液化せず

リトマス・ミルク培地 遊元(アルカリ化、酸性化せず)
(ペプトン化、凝固せず)

生理学的性質

硝酸塩還元	+(N ₂ 発生)
硝酸呼吸	+(N ₂ 発生)
グルコースの酸化的分解	+(酸解せず)
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+(強)
アルギニンヒドロラーゼ	+
インドール酢酸	-
琥珀酸発生	-
冰糖分解	-
カロチノイド発生	-
中性紅の遊元	-
メチレンブルーの遊元	-
デンプンの加水分解	-
VP反応メチルレッド試験	-
アンモニア生成	+(弱)
糖の分解(酸の生成)	
グルコース	+
キシロース	-
ラクトース	-

シユーカロース	-
デンブン	-
グリセリン	-

唯一の炭素源としての利用性

グルコース	+	コハク酸	+
キシロース	+(弱)	クエン酸	+
ラクトース	-	グルコン酸	+
シユーカロース	+	プロトカテキニ酸	+
デンブン	-	安息香酸	+
グリセリン	+	サルチル酸	-
フコース	-	PHB (P-ヒドロキシ 安息香酸)	+
トレハロース	-	ベタイン	+
メゾイノシトール	-	PAB (P-アミノ安息 香酸)	-
D-アラニン	+	-	-
L-アルギニン	+	ゲンチシン酸	+(弱)
D,L-アルギニン	+	アントラニル酸	-
L-バリン	+	-	-
ブトレシン	+	-	-

上記の如く本BIO菌はグラム陰性の桿菌であり半モロ型であり、好気的にグルコースを分解し

酸を生成する。オキシダーゼ、カタラーゼ活性などの点からシユードモナス属の一様に属すると同定した。更に種の検索を行いBIO菌の類縁菌種と見られるシユードモナス属に属する8種の菌種を選び種々の生理的性質につき比較検討した。この比較結果を下記に表示する。

BIO菌とシユードモナス属の類縁菌との性状比較表

菌種	性質		蛍光 色素	ビオチン アシニ 酸	41℃ で の 生 育	脱 氷 作用	液 化 作用	ゼラチン 液 化	でんぶん 加水 分解	硫化 水素	カルボニ トイド 生成
	E O 菌	BIO 菌									
Ps. aeruginosa	d	d	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Ps. putida	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps. syringae	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-
Ps. cichorii	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ps. stutzeri	-	-	d	+	-	+	-	+	-	-	-
Ps. mendocina	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Ps. alcaligenes	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Ps. denitrificans	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

+ : 90%以上陽性

- : 90%以上陰性

d : 10%~90%の間で陽性

上記BIO菌の生物学的性質並びに類縁菌との比較表の示す如く、BIO菌は硝酸呼吸能を有し脱氷作用を示すこと、色素を生産しないこと、生育温度の最高は36℃であることに特徴を有し、これらの性質のうち蛍光色素を生産せず、脱氷作用を示す Ps. stutzeri は41℃でかなり生育すること、でんぶんを加水分解すること、リトマスミルク培地でアルカリ化すること、グルコースを分解しないことなどの点でBIO菌と異つてゐる。又 Ps. mendocina は41℃で生育すること、カルボニトイドを生産する点でBIO菌と異り、Ps. denitrificans は硫化水素を生産すること、グルコースを分解しない点でBIO菌と相違している。シユードモナス属の菌種において生育温度の差違は菌種を区別する重要な条件ということができる。

以上の点でBIO菌は従来記載されている菌種の性状と一致しないので、BIO菌を新菌種に属する菌と同定し、シユードモナス nov. sp. LF5101 (微小研磨菌科埋属3299) と仮称する。

本発明方法を実施するにあたつては、前記した通り JIS K 3363 培地で飼育したポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤分解菌を培地に培養して、生育した菌体をポリオキシエチレン系界面活性剤を含有する溶液に懸濁して反応させらるか又は菌体を常法により処理し、例へば洗浄、超音波処理、凍結融解処理或はホモジナイザー処理其他の破壊抽出処理等を施し、分離すれば分離せずしてポリオキシエチレン系界面活性剤に接触させればよい。界面活性剤の分解度はコバルトテオシアネート活性の低下率をもつて示した。

尚上記処理物を常法により精製して活性を高めた活性物質を取得し、各種酵素的な特性も調べた。これら活性物質も本発明の分解処理方法に使用できることは勿論である。かくして本発明方法により効率よく非イオン界面活性剤を分解処理することができた。

以下実施例を示す。

実施例 1

80菌を斜面培地から10mlトリプトソイブロス中に移植し、18時間30℃で前培養した。これを種培養としてポリエチレンクリコールドデシルエーテル(80P-8)を炭素源として各50、100、200、400、600ppm含有JIS培地200ml中に移植して馴化を行つた。600ppm培地での80菌によるこれら界面活性剤の分解度については、最初コバルトチオシアネット活性100%のものがポリエチレンクリコールドデシルエーテル(80P-8)の場合12時間で25%、24時間で20%、1週間で20%に低下した。

実施例 2

ポリエチレンクリコールドデシルエーテル(80P-8)を含有するJIS K 3363培地で馴化した80菌の生分解終了培地より得た死菌体を用いて、種々の非イオン界面活性剤の分解試験を行つた。

先づ500ppmの上記生分解終了培地900

mlを遠心分離して菌体を集め、生理的食塩水で1回洗浄したものと洗浄菌体とした。培地900mlあたり菌体重量は約1.6gであつた。

供試非イオン界面活性剤は下記の通りである。

ポリオキシエチレンクリコールノニルフェニルエーテル(80P-9)

合成アルコール(U₁₂-U₁₈)エトキシレート(80P-8)(商品名リボノツクスICBライオン油脂K.K.製)

ポリエチレンクリコールドデシルエーテル(80P-8)

ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート(商品名Tween 80、東京化成K.K.製)

ポリエチレンクリコール(PEW-400, PEG 400)
約1.6gの菌体を20mlのトリス塩酸液(pH 7.5
 $5.0 \times 10^{-2} M$)に懸滴させ、これに20mlの各種非イオン界面活性剤(1000ppm水溶液)
20mlを加へた。30℃で振とう(60回、1分)
し、短時間の静止後液を4ml抜取り遠心した上清
のコバルトチオシアネット活性を測定して分解

度をしらべた。分解度は下表の通りである。

基 質	コバルトチオシアネット活性		
	0 hr	1 hr	4 hr
ポリオキシエチレンクリコールノニルフェニルエーテル	100	66	53
I C H	100	80	70
ポリオキシエチレンクリコールドデシルエーテル	100	80	70
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート Tween 80	100	97	94
PEG 400	100	97	94

実施例 3

ポリエチレンクリコールドデシルエーテル(80P-7)600ppm含有JIS培地で30℃、24時間培養した培養液1.5Lを8000rpm(10,000G)10分間遠心分離し上清と菌体とにわけた。上清を脱塩後、凍結乾燥により50mlまで濃縮した。一方菌体は0.85%生理的食塩水で2回洗浄した後、5mMトリス塩酸液に懸滴させ、超音波細胞破砕機(大岳製作所製

150W 20KC)を用いて超音波処理を行つた。

超音波処理液は18000 rpm(3.9万回)30分遠心分離し上清の酵素活性を調べた。結果は下表の通りである。

試 料	蛋白(%)	比活性(u/mg蛋白)
培養液上清	2.7	0.00
音波処理上清	3.64	0.62

反応系：基質ポリエチレンクリコールドデシルエーテル(80P-7)2mM、トリス塩酸液(pH 7.5)50mM中35℃振とう条件下で反応を行つた。

活性：ガスクロマトグラフ(GLC)を用い出発物質の減少率から表示し、1mlの酵素液が35℃、60分で1nmolの基質分解能を持つとき1単位とした。

上記の通り酵素は菌体に存在し、音波処理で可溶化されることがわかつた。

特許出願人 ライオン油脂株式会社

代理人 後藤道生

6. 前記以外の発明者

任 戸 千葉県印川市新出 1-9-3
氏 名 杉山 王吉